

益母草碱对急性心肌梗死大鼠的影响

徐玉平^{1,2}, 钱海兵^{2*}, 朱依淳^{3*}

(1. 凯里学院, 贵州 凯里 556011; 2. 贵阳中医学院, 贵阳 550002; 3. 复旦大学, 上海 201203)

[摘要] **目的:**观察益母草碱对急性心肌梗死造成的心肌缺血和心肌细胞损害的影响并探讨其作用机制。**方法:**雄性 SD 大鼠随机分为 5 组, 分别为假手术组, 模型组, 益母草碱高、低剂量组 ($30, 15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 和卡托普利阳性药组 ($4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 除假手术组外其余各组采用结扎冠状动脉左前降支的方法制备大鼠急性心肌梗死模型, 所有动物冠脉结扎前 1 周按相应剂量 *ip* 药物, 第 8 天造模, 术后继续 *ip* 给药 2 d 后, 处死动物, 2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (TTC) 染色法检测并计算心肌梗死面积, 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒测定大鼠血清中乳酸脱氢酶 (LDH), 肌酸激酶 (CK) 的水平, 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 含量。**结果:**与假手术组比较, 模型组大鼠心肌梗死面积明显增大, 血清中 LDH, CK, MDA 含量水平明显升高, 总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 水平明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与模型组比较, 益母草碱能明显减小心肌梗死大鼠左心室梗死面积, 并能明显降低梗死大鼠血清中 LDH, CK 及 MDA 的水平, 明显升高血清中 T-SOD 的活性 ($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:**益母草碱对急性心肌缺血造成的心肌损伤有良好的预防性保护作用, 其作用机制可能与提高心肌组织抗氧化能力有关。

[关键词] 益母草碱; 急性心肌梗死; 心肌缺血; 乳酸脱氢酶; 肌酸激酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)17-0113-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016170113

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160705.1445.028.html>

[网络出版时间] 2016-07-05 14:45

Effect of Leonurine on Rats of Acute Myocardial Infarction

XU Yu-ping^{1,2}, QIAN Hai-bing^{2*}, ZHU Yi-zhun^{3*}

(1. Kaili University, Kaili 556011, China; 2. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China; 3. Fudan University, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of leonurine on myocardial ischemia and myocardial cell injury caused by acute myocardial infarction, and its functional mechanism. **Method:** The model of acute myocardial infarction in rats was established through ligation of the left anterior descending coronary artery. Male SD rats were randomly divided into five groups; sham-operated group, leonurine high-dose ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) group, low-dose ($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) group, positive control group and model group. One week before the coronary artery ligation, all groups, except for the sham-operated group, were given the corresponding dose of drugs. The model was built on the eighth day, and postoperative intraperitoneal administration lasted for 2 days. The animals were sacrificed, and myocardial infarct size was measured by TTC staining. The content of lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in rat serum were determined with enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) kit. **Result:** Compared with the sham-operated group, the model group showed significant increase in myocardial infarct size, and serum LDH, CK and MDA

[收稿日期] 20150814(006)

[基金项目] 贵州省国际科技合作项目(黔科合外 G 字[2010]7012)

[第一作者] 徐玉平, 硕士, 从事中药及民族药药效物质基础及作用机制的研究, Tel:18798577730, E-mail:306597035@qq.com

[通讯作者] * 钱海兵, 教授, 博士, 从事中药及民族药药效物质基础及作用机制的研究, Tel:13984350701, E-mail:279753407@qq.com;

* 朱依淳, 博士, 教授, 博士生导师, 从事药理学研究, Tel:021-51980018, E-mail:yizhunzhu@gmail.com

content, and significant decrease in total superoxide dismutase (T-SOD) ($P < 0.05$, $P < 0.01$); compared with the model group, the leonurine group showed significant decrease in myocardial infarct size, and serum LDH, CK and MDA content, and significant increase in total superoxide dismutase (T-SOD) ($P < 0.05$, $P < 0.01$).

Conclusion: Leonurine has a good protective effect on myocardial injury caused by acute myocardial ischemia. Its mechanism may be related to the improvement of the antioxidant capacity of myocardial tissues.

[**Key words**] leonurine; acute myocardial infarction; myocardial ischemia; lactate dehydrogenase; creatine kinase

益母草作为活血化瘀的传统中药,对心肌梗死、心绞痛、冠心病等心血管系统疾病有一定的防治作用。益母草的药理作用和它所含的多种生物碱类成分密切相关,包括益母草碱,水苏碱益母草碱,益母草啶和益母草宁等,其中益母草碱是重要有效成分。据相关文献报道,益母草碱强化缺血预处理可改善心肌缺血再灌注所致心肌组织超微结构的损伤^[1],对大鼠急性心肌缺血损伤具有保护作用^[2-4],水苏碱对大鼠心肌缺血再灌注的损伤也有保护作用^[5],并且益母草碱和水苏碱合用抗小鼠急性心肌缺血的作用优于二者单用^[6]。本实验采用结扎冠状动脉左前降支的方法制备大鼠急性心肌梗死模型,通过 TTC 染色法计算心肌梗死面积、试剂盒测定血清中乳酸脱氢酶(LDH),肌酸激酶(CK),超氧化歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)的含量,观察益母草碱对急性心肌梗死造成的心肌缺血和心肌细胞损害的影响并探讨其作用机制。

1 材料

1.1 动物 雄性 SPF 级 SD 大鼠,体重 180 ~ 220 g,由复旦大学药学院动物中心提供,合格证号 SCXK(沪)2008-0016。

1.2 药物及试剂 益母草碱由复旦大学提供,纯度 > 98%;卡托普利对照品(上海市药品检验所,批号 20141210),三苯基四氮唑(TTC,美国 Sigma 公司);CK,LDH,SOD,MDA 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20130422)。

1.3 仪器 DHX-150 型小动物呼吸机(成都仪器厂),Infinite M200 型酶标仪(瑞士 Tecan 公司)。

2 方法

2.1 大鼠急性心肌梗死模型制备^[7] 雄性 SD 大鼠,称体重后 ip 7% 水合氯醛溶液(0.5 mL/100 g)麻醉,用胶圈将大鼠四肢仰面固定于手术台,接小动物呼吸机,行气管插管。呼吸频率 60 次/min,潮气量 8 ~ 12 mL,呼吸比为 1:1。剪掉大鼠胸前左侧鼠毛,碘伏消毒,距皮肤中线 0.5 cm 处切开皮肤,沿着肌肉纹理进行钝性分离,两侧拉钩固定。于第 3 ~ 4

肋间隙开胸,调节开胸器扩张胸腔,轻轻撕开心包膜,暴露心脏,6 ~ 0 号丝线距主动脉根部约 2 mm 处永久性结扎冠状动脉左前降支,观察到心尖变白、左心室壁被动跳动,心脏出现因缺血而致的颜色改变认为手术成功。术后用棉棒清理胸腔内积血,而后迅速关闭胸腔,缝合皮肤,手术区域再次碘伏消毒。待大鼠恢复自主呼吸后撤掉呼吸机。造模动物分笼、常规饲养。假手术组麻醉后同样的方法气管插管,第 3 ~ 4 肋间隙开胸,撕开心包膜,暴露心脏,不行冠状动脉结扎手术,直接关闭胸腔,缝合皮肤即可。

2.2 动物分组及给药 大鼠 84 只,随机分为 5 组。根据课题组前期实验数据结合实验结果确定益母草碱的高、低给药剂量^[8]。假手术组($n = 10$),梗死模型组($n = 20$),益母草碱高剂量组($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $n = 20$),益母草碱低剂量组($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $n = 17$),卡托普利阳性药组($4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $n = 17$)。冠脉结扎前 1 周各组动物按相应剂量 ip 药物,第 8 天造模,术后继续给药 2 d,处死动物并取材。假手术组和模型组腹腔给予生理盐水。

2.3 标本的留取和处理 7% 水合氯醛(0.5 mL/100 g)麻醉大鼠,腹主动脉取血,肝素钠抗凝,4 °C 条件下 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,吸取血清于 -80 °C 保存。迅速将心脏取出,生理盐水清洗,滤纸吸干,用铝箔纸包起,立即于 -80 °C 保存。

2.4 TTC 法测定心肌梗死面积 将大鼠心脏放置于 -80 °C 冰箱冷冻 10 min 后取出,切成 2 mm 厚度几个水平薄片,0.1% TTC 溶液中 37 °C 水浴加热 15 min,生理盐水清洗 3 次后终止反应,数码相机拍照,Image Tool 图像分析软件计算梗死面积。梗死百分率 = 梗死区域面积/左心室面积 × 100%。其中,白色区域为梗死区,红色区域为非梗死区。

2.5 血浆中心肌酶 LDH 和 CK 的测定 取血清样本,按试剂盒步骤进行测定。

2.6 血浆中抗氧化酶总 SOD 的测定 取血清样本,按试剂盒步骤进行测定。

2.7 血浆中 MDA 水平的测定 取血清样本,按试剂盒步骤进行测定。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间两两比较用单因素方差分析,两组之间以 t 检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对心梗大鼠梗死面积的影响 与假手术组比较,模型组梗死面积是 46.03%,明显升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,益母草碱 30,15 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组及卡托普利均能不同程度减小梗死面积,梗死面积分别为 29.55%,35.57%,37.22%,具有统计学意义 ($P < 0.05$)。由此可见,益母草碱能够减小心梗大鼠的梗死面积。见图 1,表 1。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 益母草碱 30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; D. 益母草碱 15 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; E. 卡托普利组

图 1 各组大鼠心脏形态学观察

Fig.1 Cardiac morphological observation

3.2 对心梗大鼠血清中 LDH,CK 活性的影响 与假手术组比较,模型组大鼠血清中 LDH 及 CK 的活性显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,益母草碱 30,15 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组均可显著降低两者在血清中

表 3 益母草碱对心梗大鼠血清中 SOD,MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of leonurine on SOD,MDA levels in serum of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	T-SOD/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	Cu-Zn SOD/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	MDA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
假手术	-	84.71 \pm 6.46	46.72 \pm 6.38	2.58 \pm 0.28
模型	-	51.26 \pm 2.49 ³⁾	35.96 \pm 18.79	4.46 \pm 0.63 ⁴⁾
益母草碱	30	88.55 \pm 6.02 ¹⁾	44.14 \pm 17.64	1.89 \pm 0.33 ²⁾
	15	81.04 \pm 10.44 ¹⁾	36.54 \pm 4.89	3.03 \pm 0.50 ¹⁾
卡托普利	4	85.03 \pm 1.47 ¹⁾	41.90 \pm 22.65	3.15 \pm 0.26 ¹⁾

4 讨论

建立心肌梗死动物模型的方法有多种,如冠状动脉结扎法、药物法、血栓形成法、冷冻法等,各有其优缺点。冠状动脉结扎法制备心肌梗死模型,虽然

表 1 益母草碱对梗死面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 1 Effects of leonurine on infarct size ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	心梗面积/%
假手术	-	0
模型	-	46.03 \pm 2.95 ¹⁾
益母草碱	30	29.55 \pm 4.73 ²⁾
	15	35.57 \pm 5.52 ²⁾
卡托普利	4	37.22 \pm 5.19 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

的活性 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 益母草碱对心梗大鼠血清中 LDH,CK 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of leonurine on LDH,CK content in serum of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	LDH/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	CK/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$
假手术	-	531.46 \pm 22.73	0.09 \pm 0.06
模型	-	681.44 \pm 18.22 ⁴⁾	0.36 \pm 0.01 ⁴⁾
益母草碱	30	518.88 \pm 18.18 ²⁾	0.19 \pm 0.02 ²⁾
	15	549.51 \pm 29.69 ²⁾	0.22 \pm 0.04 ²⁾
卡托普利	4	544.41 \pm 4.80 ²⁾	0.26 \pm 0.05 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与假手术组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

3.3 对心梗大鼠血清 SOD 及 MDA 水平的影响

与假手术组比较,模型组血清中的 T-SOD 活性在心肌缺血后明显降低,MDA 含量在心肌缺血后明显升高。与模型组比较,给药组处理后 T-SOD 活性有不同程度的升高;给药组处理后 MDA 含量均有不同程度的降低 ($P < 0.05$);Cu-Zn SOD 各组间无明显变化,提示益母草碱能提高缺血心肌抗氧化能力。见表 3。

动物损伤大,影响因素多,死亡率较高,但其可操作性强,模型稳定,而且它可以最大限度地模拟临床,与心肌梗死实际发病过程更符合^[9],是目前最常用的制作心肌梗死模型的方法。因而在本实验中,笔

者选用冠状动脉结扎法制备心肌梗死造成的急性心肌缺血模型,这与文献[2-3]所采用的 *ip* 垂体后叶素诱发大鼠急性心肌缺血损伤不同。实验结果表明,益母草碱能减小心肌梗死大鼠的梗死面积,与模型组比较具有统计学意义。

目前诊断 AMI 使用的最多的血清心肌损伤生化标志物是肌酸激酶同工酶(CK-MB),是分析心肌梗死的经典指标。因此,本研究以血清中 LDH 及 CK 水平的变化作为心肌损伤的心肌酶谱指标,反映冠状动脉结扎后急性心肌缺血大鼠的心肌损伤状况,这与文献[3]中使用血清及心肌的肌钙蛋白(cTnT)水平作为心肌损伤诊断的“金标准”不同^[10-11]。本实验结果表明,心肌缺血缺氧时,由于细胞膜的通透性发生改变,可导致细胞内 LDH,CK 释放进入血清,使其在血清中活力升高,如果细胞破坏越多,LDH,CK 活性越强。本实验中给药组均可明显抑制 CK 和 LDH 释放,说明益母草碱能保护心肌细胞膜的完整性,明显减轻心肌缺血引起的心肌细胞损伤。

本实验中,益母草碱治疗组能显著降低 MDA 水平和升高抗氧化酶 SOD 的活性,这与文献[2]报道基本一致。说明益母草碱可以提高体内抗氧化酶活性,对抗自由基引发的脂质过氧化反应,保护缺血心肌细胞。

综上所述,本研究发现益母草碱能通过减小心肌梗死面积、降低心肌酶谱活性,发挥对急性缺血心肌损伤的良好的预防性保护作用,其作用机制可能与提高心肌组织抗氧化能力有关。

[参考文献]

[1] 彭勃,林峰,黄雪珊. 缺血预处理前加用益母草碱对大鼠心肌再灌注损伤的影响[J]. 心血管病防治知识,2011,6(3):24-25.
[2] 熊莺,杨解人. 益母草碱对大鼠急性心肌缺血损伤血管舒缩功能及抗氧化作用的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(7):34-37.

[3] 熊莺,杨解人. 益母草碱对大鼠急性心肌缺血损伤心肌肌钙蛋白 T 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(2):21-24.
[4] 马玉红,杨解人. 水苏碱对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(5):40-42.
[5] Chen C X, Kwan C Y. Endothelium-independent vasorelaxation by leonurine aplant alkaloid purified from Chinese motherwort [J]. Life Sci, 2001, 68(8):953-960.
[6] 程永凤,王效山,陈志武. 益母草碱和水苏碱合用抗小鼠急性心肌缺血的作用[J]. 安徽医科大学学报,2010,45(1):58-61.
[7] Zhu Y Z, Zhu Y C, Li J, et al. Effects of losartan on haemodynamic Parameters and angiotensin receptor mRNA levels in rat heart after myocardial infarction[J]. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2000, 1(3):257-262.
[8] 刘新华. 益母草碱的合成及其对心血管保护作用的研究[D]. 上海:复旦大学药学院,2009.
[9] Bhindi R, Witting P K, McMahon A C, et al. Rat models of myocardial infarction. Pathogenetic insights and clinical relevance [J]. Thromb Haemost, 2006, 96(5):602-610.
[10] Goktekin O, Melek M, Gorenek B, et al. Cardiac troponin T and cardiac enzymes after external transthoracic cardioversion of ventricular arrhythmias in patients with coronary artery disease [J]. Chest, 2002, 122(6):2050-2054.
[11] Zaricha S, Qamar A, Werdmann M, et al. Value of a single troponin T at the time of presentation as compared to serial CK-MB determinations in patients with suspected myocardial ischemia [J]. Clin Chim Acta, 2002, 326:185-192.

[责任编辑 周冰冰]